



4

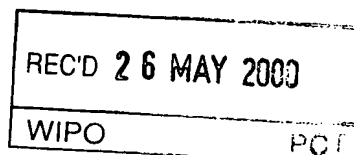
PCT/EP 00/00174



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT

CONFÉDÉRATION SUISSE

CONFEDERAZIONE SVIZZERA



EP 00/174

Bescheinigung

Die beiliegenden Akten stimmen mit den ursprünglichen technischen Unterlagen des auf der nächsten Seite bezeichneten Patentgesuches für die Schweiz und Liechtenstein überein. Die Schweiz und das Fürstentum Liechtenstein bilden ein einheitliches Schutzgebiet. Der Schutz kann deshalb nur für beide Länder gemeinsam beantragt werden.

Attestation

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces techniques originales de la demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein spécifiée à la page suivante. La Suisse et la Principauté de Liechtenstein constituent un territoire unitaire de protection. La protection ne peut donc être revendiquée que pour l'ensemble des deux Etats.

Attestazione

Gli uniti documenti sono conformi agli atti tecnici originali della domanda di brevetto per la Svizzera e il Liechtenstein specificata nella pagina seguente. La Svizzera e il Principato di Liechtenstein formano un unico territorio di protezione. La protezione può dunque essere rivendicata solamente per l'insieme dei due Stati.

Bern, 17. April 2000

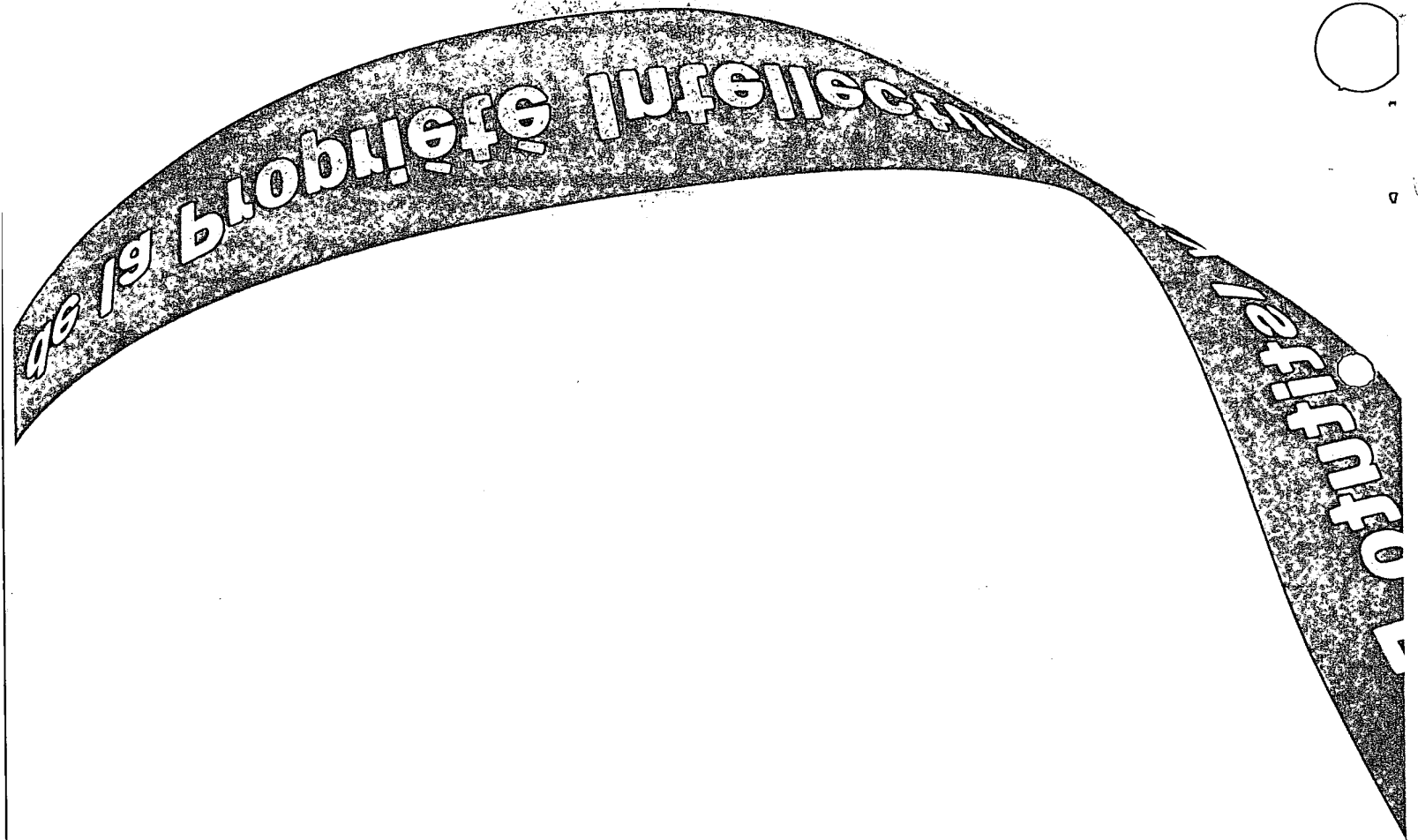
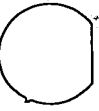
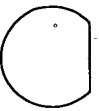
**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Eidgenössisches Institut für Geistiges Eigentum
Institut Fédéral de la Propriété Intellectuelle
Istituto Federale della Proprietà Intellettuale

Patentverfahren
Administration des brevets
Amministrazione dei brevetti

Rolf Hofstetter
Rolf Hofstetter

00-30-00-00



NO. 05.00

Patentgesuch Nr. 1999 0051/99

HINTERLEGUNGSBESCHEINIGUNG (Art. 46 Abs. 5 PatV)

Das Eidgenössische Institut für Geistiges Eigentum bescheinigt den Eingang des unten näher bezeichneten schweizerischen Patentgesuches.

Titel:

Neue Verwendung von Antikörpern und deren Derivaten in der aktiven spezifischen Krebs-Immuntherapie.

Patentbewerber:

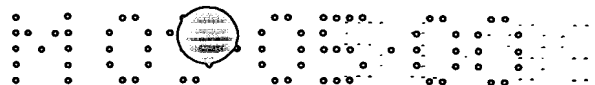
Dr. Helmut Eckert
Hohestrasse 167
4104 Oberwil BL

Anmeldedatum: 13.01.1999

Voraussichtliche Klassen: A61K, C07K

00-30-004

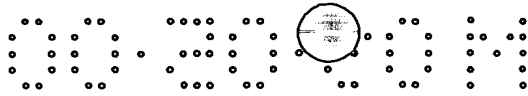
THIS PAGE BLANK (USPTO)



**Neue Verwendung von Antikörpern und deren Derivaten in der aktiven
spezifischen Krebs-Immuntherapie**

Inhaltsverzeichnis:

1. Beschreibung	Seite 1 - 9
2. Patentansprüche	Seite 10
3. Zusammenfassung	Seite 11
4. Abbildungen	Abbildung 1 - 7



Neue Verwendung von Antikörpern und deren Derivaten in der aktiven spezifischen Krebs-Immuntherapie

Beschreibung

Antikörper gegen Tumor-assoziierte Antigene oder deren Derivate mit gleichem Idiotyp können zur Vakzinierung gegen Krebserkrankungen verwendet werden:

Mit der Entdeckung der Hybridomtechnologie ist es möglich geworden, monoklonale Antikörper (MAK) gegen verschiedenste Antigene zu generieren. Diese generell für alle biologischen Fragestellungen einsetzbare Technologie hat auch in der Krebsforschung einen nicht mehr wegzudenkenden Platz eingenommen. In den letzten 20 Jahren sind MAK gegen eine Vielzahl von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) hergestellt worden. TAA sind Strukturen, die bevorzugt auf der Zellmembran von Tumorzellen exprimiert sind, dadurch eine Unterscheidung zu nicht-malignem Gewebe ermöglichen und daher als Zielpunkte für diagnostische und therapeutische Anwendungen auf der Basis von spezifischen MAK oder davon abgeleiteten Derivaten gesehen werden.

Direkte therapeutische Anwendungen von MAK gegen TAA beruhen auf passiven Immuntherapien, das heißt ein MAK oder ein Derivat wird systemisch in geeigneter Menge an Krebspatienten verabreicht und übt eine therapeutische Wirkung nur aus, solange die Konzentration im Organismus dafür genügend groß ist. Die biologische Halbwertszeit solcher Agentien hängt von ihrer Struktur ab und beträgt wenige Stunden bis mehrere Tage. Daher ist es notwendig, wiederholte Applikationen vorzunehmen. Das führt bei Verwendung von xenogenen Antikörpern (z.B. murine MAK) aber zu unerwünschten Immunreaktionen, die eine mögliche therapeutische Wirkung neutralisieren und gefährliche Nebenwirkungen (anaphylaktische Reaktionen) bedingen können. Daher können solche Immuntherapeutika nur für eine begrenzte Zeit verabreicht werden.

Ein anderer Ansatzpunkt für Immuntherapie von Krebs liegt in der selektiven Aktivierung des Immunsystems von Krebspatienten, maligne Zellen zu bekämpfen. Das wird mittels verschiedenster Formen von Krebsvakzinen versucht. Dazu gehören Impfungen mit autologen oder allogenen Tumorzellen, chemisch oder molekularbiologisch modifizierten autologen oder allogenen Tumorzellen, isolierten oder mit Hilfe von chemischen oder molekularbiologischen Methoden hergestellten TAA, daraus abgeleiteten Peptiden, neuerdings auch Impfungen mit DNA, die für TAA oder daraus abgeleiteten Strukturen kodieren, etc. Eine alternative Methode beruht auf der Verwendung von anti-idiotypischen Antikörpern zur Vakzinierung gegen Krebs. Geeignete anti-idiotypische Antikörper können ein TAA immunologisch nachahmen. Sie induzieren als Fremdproteine (z.B. murine Antikörper, Ziegen-Antikörper etc.) nach Vakzinierung - im Gegensatz zu den eigentlichen menschlichen Tumorantigenen, die als Selbst-Strukturen oft nur wenig immunogen sind - im Menschen eine starke Immunantwort. Daher können anti-idiotypische Antikörper als immunogener Ersatz eines Tumorantigens zur Impfung verwendet werden.

Unterschiedlich zu passiven Immuntherapien mit Anti-Tumorantikörpern genügen für die aktive spezifische Krebs-Immuntherapie im Prinzip sehr kleine Mengen eines geeigneten Impfstoffes, um für Monate bis Jahre eine Immunität zu induzieren, die bei Abschwächung durch Booster-Impfungen wieder aufgefrischt werden kann. Darüberhinaus kann bei aktiver Immunisierung sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunität induziert werden, deren Zusammenspiel eine effektive Schutzwirkung ergeben kann.

Zusammenfassend beruht die bisherige Verwendung von Antikörpern oder von deren Derivaten in der Krebs-Immuntherapie im wesentlichen auf 2 Prinzipien:

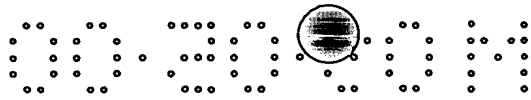
- Passive Therapie mit Antikörpern oder deren Derivaten, die gegen TAA gerichtet sind.
- Aktive Immunisierung (Vakzinierung) mit Antikörpern oder deren Derivaten, die gegen den Idiotyp von Antikörpern mit Spezifität gegen TAA gerichtet sind.

Im Verlauf der Entdeckung und nachfolgender Charakterisierung von verschiedensten TAA hat sich herausgestellt, daß diese wichtige Funktionen für Krebszellen haben. Sie ermöglichen den entarteten Zellen, charakteristische Eigenschaften für den malignen Phänotyp wie z.B. vermehrte Adhäsionsfähigkeit auszuüben, die für die Etablierung von Metastasen von großer Bedeutung sind. Allerdings können solche Antigene durchaus in bestimmten Stadien auch auf normalen Zellen exprimiert sein, wo sie für normale Funktionen dieser Zellen verantwortlich sind. Ohne Anspruch auf Vollständigkeit seien hier einige Beispiele für solche Antigene angeführt:

- N-CAM (Neuronal Cell Adhesion Molecule), das oft auf Tumoren neuronalen Ursprungs exprimiert ist und homophile Adhäsion bewirkt (J.Cell Biol.118:937, 1992).
- Das Lewis Y Kohlenhydratantigen, das auf der Mehrzahl der Tumoren epithelialen Ursprungs aufscheint, aber auch während der fötalen Entwicklung epithelialer Gewebe eine wichtige Rolle spielt. Es wurde gezeigt, daß die Expression dieses Antigens in Lungenkrebs stark mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist, da Lewis Y positive Krebszellen offensichtlich ein höheres metastatisches Potential haben (N.Engl.J.Med.327:14, 1992).
- CEA (Carcino Embryonic Antigen), das häufig auf epithelialen Tumoren des Gastro-Intestinaltraktes vorkommt und als Selbstadhäsionsmolekül identifiziert wurde (Cell 57:327, 1989).
- Ep-CAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), daß auf fast allen Tumoren epithelialen Ursprungs exprimiert ist, aber auch auf vielen normalen Epithelien vorkommt, das als Selbstadhäsionsmolekül charakterisiert wurde und daher als pan-epitheliales Adhäsionsantigen klassifiziert werden kann (J.Cell Biol.125:437, 1994).

Die vorstehende Erfindung beinhaltet neuartige Verwendungen von Antikörpern oder deren Derivaten, die gegen TAA gerichtet sind. Diese neuen therapeutischen Anwendungen unterscheiden sich substantiell von den beiden zuvor genannten, bisher bekannten prinzipiellen therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten:

Die Bindungsregion eines Antikörpers gegen ein TAA kann nach dem "Schlüssel-Schloß-Prinzip" ein strukturell komplementäres Abbild des Bindungs-Epitopes des jeweiligen TAA's darstellen. Das bedeutet, daß ein solcher Antikörper in seinem Idiotyp eine Strukturinformation des Epitopes des TAA trägt, gegen das er gerichtet ist. Wird daher ein Krebspatient mit einem geeigneten, immunogenen Antikörper gegen ein TAA geimpft (also z.B. mit einem murinen MAK gegen ein TAA), werden dagegen im Patienten Antikörper gebildet, die zum Teil gegen den Idiotyp des als Vakzine eingesetzten Antikörpers gerichtet sind und nach dem "Schlüssel-Schloß-Prinzip" das Epitop des TAA strukturell nachahmen können. Daraus folgt, daß durch eine solche Impfung im Krebspatienten gewissermaßen lösliche Varianten des Epitopes des TAA generiert werden, die als aktiv induzierte autologe Antikörper für lange Zeiträume wirken können und deren Titer in geeigneten Abständen durch Booster-Impfungen wieder aufgefrischt werden können. Die physiologische Wirkung einer solchen, durch Impfung mit einem Antikörper gegen ein TAA induzierten Immunantwort hängt naturgemäß von der Funktion des jeweiligen TAA ab. Hat das TAA beispielhaft eine Funktion als Rezeptor für die Adhäsion von Tumorzellen an einen Liganden auf Endothelzellen des Gefäßsystems (eine solche Eigenschaft ist wichtig für die Fähigkeit von disseminierten Krebszellen, aus dem Gefäßsystem auszutreten und sich in Gewebe festzusetzen, um dort eine Metastase auszubilden), dann wird diese Adhäsionsfähigkeit durch Vakzinierung mit einem geeignetem Antikörper gegen dieses TAA herabgesetzt, weil im Kreislauf und im Gewebe permanent induzierte Antikörper vorhanden



sind, die die Interaktion des TAA mit seinem Liganden kompetitieren, da sie das TAA in löslicher Form nachahmen.

Allgemein ausgedrückt, kann nach den obenstehenden Ausführungen durch Vakzinierung mit geeigneten Antikörpern gegen TAA, die eine Funktion für die Malignität von Tumorzellen haben, erreicht werden, daß die induzierte Immunantwort mit der Funktion des TAA in dessen Wechselwirkung mit seinem Liganden interferiert und diese erschwert oder verhindert. Das bedeutet, daß Krebszellen für den malignen Phänotyp wichtige Eigenschaften nicht oder nicht ausreichend ausüben können, wodurch die Entwicklung der Erkrankung verlangsamt oder gestoppt werden kann und insbesondere in frühen Stadien die Ausbildung von Metastasen unterdrückt werden kann.

Eine besondere Situation ergibt sich, wenn die Funktion des TAA in der Selbstadhäsion liegt. In solchen Fällen sind offensichtlich bestimmte Epitope des TAA für die homophile Bindung mit einem gleichen TAA auf einer anderen Zelle verantwortlich. Beispiele für solche TAA sind unter anderem N-CAM (Neuronal Cellular Adhesion Molecule), CEA (Carcino Embryonic Antigen) und Ep-CAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule). Antikörper, die gegen Epitope von Selbstadhäsionsantigenen gerichtet sind, welche in diese Funktion involviert sind, können nach den obenstehenden Ausführungen eine komplementäre Strukturinformation eines solchen Epitopes tragen. Daher kann, entsprechend den obenstehenden Ausführungen, durch Vakzinierung mit solchen Antikörpern die Ausbildung von Antikörpern induziert werden, die die Eigenschaften dieser Selbstadhäsion in der Bindungsreaktion tragen. Das bedeutet, daß solche induzierten Antikörper wiederum an dem Selbstadhäsions-TAA binden können, da in einem solchen Fall Rezeptor und Ligand ident sind. Damit kann durch Impfung von Krebspatienten mit geeigneten Antikörpern gegen Selbstadhäsions-TAA eine Immunantwort induziert werden, die wiederum direkt an Tumorzellen bindet und dadurch vielfältige therapeutische Wirkungen auslöst. Einerseits wird die für maligne Zellen wichtige Fähigkeit der Selbstadhäsion blockiert und andererseits können durch die Bindung der induzierten Antikörper an die Krebszellen humane Effektorfunktionen wie Komplement abhängige Lyse und/oder Lyse durch Aktivierung von zytotoxischen Effektorzellen ausgelöst werden, die zur Zerstörung der Krebszellen führen.

Durch alle oben genannten Mechanismen und Wirkungen kann die Vakzinierung von Krebspatienten mit geeigneten Antikörpern gegen TAA die Ausbildung neuer Metastasen unterdrücken und die Disseminierung der Erkrankung zumindestens verlangsamen. In frühen Krankheitsstadien, zum Beispiel nach erfolgreicher Operation eines Primärtumors (adjuvantes Stadium), werden durch solche Impfungen restliche, disseminierte Tumorzellen daran gehindert, sich als neue Metastasen zu etablieren. Dadurch kann die rückfallsfreie Lebensspanne und damit auch die Gesamtüberlebenszeit solcher Patienten verlängert werden. Durch solche Impfungen und in geeigneten Abständen durchgeführte Auffrischungsimpfungen kann gegebenenfalls ein lebenslanger Schutz vor der Ausbildung von Metastasen erreicht werden. Von besonderem Interesse sind Vakzinierungen von Krebspatienten mit geeigneten Antikörpern gegen ein Selbstadhäsions-TAA; da in diesen Fällen, wie oben beschrieben, durch einen zusätzlichen direkten Angriff der induzierten Immunantwort auf Tumorzellen eine verstärkte therapeutische Wirkung möglich ist.

Die durch Vakzinierung mit geeigneten Antikörpern gegen TAA induzierte, therapeutisch wirksame Immunantwort ist durch die Bindungsregion dieser Antikörper, ihrem Idiotyp, determiniert. Daher können im Prinzip statt intakter Antikörper auch Fragmente oder Derivate dieser Antikörper erfolgreich zur Vakzinierung eingesetzt werden, solange diese Derivate den Idiotyp des jeweiligen Ausgangs-Antikörpers weiterhin beinhalten. Als Beispiele, jedoch nicht auf diese eingeschränkt, seien erwähnt: F(ab)₂-Fragmente, F(ab)-Fragmente, Fv-Fragmente, die entweder nach an sich bekannten biochemischen Methoden (enzymatische Spaltung) oder nach an sich bekannten Methoden der Molekularbiologie hergestellt werden können, sowie Antikörperderivate, die nach an sich bekannten

chemischen, biochemischen oder molekularbiologischen Methoden hergestellt werden können, wie z.B. mit Fettsäuren an freien Aminofunktionen amidierte Antikörper zwecks Erhöhung der Lipophilie zur Inkorporierung in Liposomen.

Wie häufig bei Vakzinen üblich, können die geeigneten Antikörper gegen TAA oder deren Fragmente und Derivate mit Vakzine-Adjuvantien gemeinsam formuliert werden. Durch solche Adjuvantien kann die Immunantwort verstärkt werden. Als Beispiele für Adjuvantien, jedoch nicht auf diese eingeschränkt, seien erwähnt: Aluminium-hydroxid (Alu-Gel), Derivate von Lipopolysaccharid, Bacillus Calmette Guerin (BCG), Liposomenbereitungen, Formulierungen mit zusätzlichen Antigenen, gegen die das Immunsystem bereits eine starke Immunantwort gemacht hat, wie z.B. Tetanus Toxoid oder Bestandteile von Influenza Viren, gegebenenfalls in einer Liposomenbereitung.

Krebszellen exprimieren häufig mehrere TAA gleichzeitig, gegen die für Vakzinierungen geeignete Antikörper zur Verfügung stehen oder generiert werden können. Für eine verstärkte, unter Umständen synergistische Wirkung der induzierten Immunantwort, um die potentielle Gefahr der Selektion von Antigen-negativen Varianten zu minimieren und um möglicher Tumorzellheterogenität entgegenzuwirken, kann es günstig sein, eine Kombination von zwei oder mehreren geeigneten Antikörpern oder deren Fragmenten oder Derivaten gleichzeitig zur Vakzinierung zu verwenden.

Die Anwendung von geeigneten Antikörpern gegen TAA, oder von deren Derivaten oder Fragmenten als Vakzinen unterscheidet sich substantiell von den bekannten Anwendungen solcher Anti-TAA Antikörper für die passive Immuntherapie, einige wesentliche Vorteile des in dieser Erfindung vorgestellten Ansatzes sind wie folgt zusammengefaßt:

Antikörper gegen TAA zur passiven Immuntherapie von Krebs:

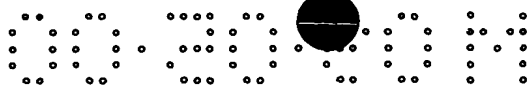
- Hohe Dosis (≥ 100 mg / Infusion)
- Kurze Wirkung durch Elimination des Wirkstoffes
- Xenogene Antikörper unerwünscht wegen Immunogenität
- Therapiedauer insbesondere bei xenogenen Antikörpern limitiert

Antikörper gegen TAA zur therapeutischen Vakzinierung gegen Krebs:

- Niedrige Dosis (< 1 mg/Impfung)
- Lang andauernde Wirkung der direkt induzierten Immunantwort
- Xenogene Antikörper erwünscht, da die Wirkung auf Immunogenität beruht
- Therapiedauer unlimited (Auffrischungsimpfungen)

In weiterer Folge wird in dieser Erfindung experimentell belegt, daß die Vakzinierung mit einem bestimmten murinen MAK (HE2), der gegen das Selbstadhäsions-TAA Ep-CAM gerichtet ist, oder die Vakzinierung mit seinem F(ab)'₂-Fragment, direkt zur Induktion von Antikörpern führt, die selektiv auf menschlichen Tumorzellen binden, die dieses Antigen tragen. Damit wird beispielhaft, aber ohne jede Einschränkung gezeigt, daß durch die Vakzinierung mit geeigneten Antikörpern gegen ein Selbstadhäsions-TAA, oder deren Derivaten, die zumindestens den Idiotyp des Ausgangsantikörpers enthalten, eine Immunantwort induziert wird, die therapeutische Wirksamkeit bei Krebserkrankungen haben kann.

Der murine monoklonale Antikörper HE2 wurde nach an sich beschriebenen Standardverfahren der Hybridomtechnologie generiert (siehe z.B. H.Zola. Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques. CRC Press, Inc. ISBN 0-8493-6476-0; 1988): Balb/c-Mäuse wurden mit menschlichen Kolorektal-Krebszellen nach Standardprotokollen



immunisiert. Die Milzzellen wurden mit der Maus-Myelomlinie P3X63Ag8 fusioniert und Hybridome selektioniert, die Antikörper produzieren, die selektiv an humanen epithelialen Krebszellen, aber nicht an WM9 Melanomzellen binden. Letztlich wurde ein Hybridom ausgewählt, das einen IgG2a / kappa Antikörper sezerniert. Dieser Antikörper wurde HE2 genannt. HE2 bindet an Ep-CAM, wie durch Westernblotanalyse mit Membranen von KATO III Magenkrebszellen gezeigt im Vergleich mit einem bekannten anti-Ep-CAM Antikörper (KS1-4) gezeigt wurde.

In den nun folgenden Beispielen, die die vorliegende Erfindung weiter erläutern, aber nicht einschränken sollen, wurden folgende Materialien verwendet:

Mikrotiterplatten:	Immunoplates II (Nunc)
Zelllinien:	KATO III: menschliche Magenkrebszelllinie, Ep-CAM positiv (ATCC HTB 103) WM 9: menschliche Melanomzelllinie, Ep-CAM negativ
Medium A:	RPMI 1640 + 2 g/l NaHCO_3 100 U/ml Penicillin G 100 µg/ml Streptomycinsulfat 4 mM Glutamin 10 % foetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)
Bindungspuffer:	15 mM Na_2CO_3 35 mM NaHCO_3 3 mM NaN_3 pH-Wert: 9,6
PBS deficient:	138 mM NaCl 1,5 mM KH_2PO_4 2,7 mM KCl 6,5 mM Na_2HPO_4 pH-Wert: 7,2
Fixierlösung:	0,1 % Glutardialdehyd in physiologischer NaCl-Lösung
Waschpuffer A:	2% NaCl 0,2% Triton X-100 in PBS deficient
Waschpuffer B:	0,05 % Tween 20 in PBS deficient
Blockierungspuffer A:	5 % foetales Kälberserum (hitzeinaktiviert) in PBS deficient
Blockierungspuffer B:	1 % Rinderserumalbumin 0,1 % NaN_3 in PBS deficient
Verdünnungspuffer A:	2% foetales Kälberserum (hitzeinaktiviert) in PBS deficient
Verdünnungspuffer B:	PBS deficient

Färbepuffer:

24,3 mM Zitronensäure
51,4 mM Na_2HPO_4
pH-Wert: 5,0

Substrat:

40 mg o-Phenylendiamin Dihydrochlorid
100 ml Färbepuffer
20 μl H_2O_2 (30%)

Stopplösung:

4 N H_2SO_4

Um die direkte humorale Immunantwort auf die Vakzinierung mit dem F(ab)'_2 -Fragment des murinen MAK HE2 untersuchen zu können, wurden Ziegen mit diesem Fragment immunisiert. Das Fragment wurde nach an sich bekannten und beschriebenen Methoden durch Spaltung von HE2 mit Pepsin hergestellt und gereinigt. 2 Ziegen wurden mit je 1,5 mg des F(ab)'_2 -Fragmentes in 3 ml PBS deficient zusammen mit 3ml von Freunds Complete Adjuvant (Difco) an multiplen Stellen intradermal vakziniert. Am Tag 8 wurde eine erste Booster-Impfung wie an Tag 1 gegeben, aber mit Freunds Incomplete Adjuvans (Difco). Am Tag 29 wurde in gleicher Weise eine zweite Booster-Impfung gegeben, bei der aber kein Adjuvans zugesetzt wurde. Blut zur Serumgewinnung für die Analyse der entstandenen Immunantwort wurde vor Impfbeginn und am Tag 54 abgenommen.

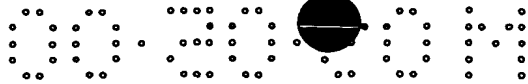
Zunächst wurde das gewonnene und gepoolte Ziegen-Immunserum im Vergleich zu einem Prä-Serum auf Immunglobuline untersucht, die gegen den MAK HE2 gerichtet sind, um die Total-Immunantwort der vakzinierten Ziegen zu bestimmen. Diese Untersuchung wurde mit Hilfe eines ELISA Tests wie folgt durchgeführt:

100 μl Aliquots des MAK HE2 (Lösung mit 10 $\mu\text{g/ml}$ in Bindungspuffer) werden in den Löchern einer Mikrotiterplatte 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen der Platte mit Waschpuffer A werden je 200 μl des Blockierungspuffers A zugesetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Platte wie oben beschrieben werden je 100 μl Aliquots der zu testenden Ziegenserum in Verdünnungen von 1:100 bis 1:1 000 000 in Verdünnungspuffer A 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Platte wie oben beschrieben werden je 100 μl des Peroxidase- konjugierten Kaninchen anti-Ziegen-Ig Antikörpers (Zymed) in einer Verdünnung von 1:1000 in Verdünnungspuffer A zugesetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platte wird viermal mit Waschpuffer A und zweimal mit Färbepuffer gewaschen. Die Antikörperbindung wird durch Zusatz von je 100 μl des spezifischen Substrats nachgewiesen und die Farbreaktion durch Zugabe von je 50 μl Stopplösung nach ca. 3 Minuten abgebrochen. Die Auswertung erfolgt durch Messen der optischen Dichte (OD) bei 490nm (Wellenlänge der Referenzmessung ist 620nm).

Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abbildung 1 dargestellt: Die Ziegen haben durch die Vakzinierungen mit dem F(ab)'_2 -Fragment des MAK HE2 eine starke Immunantwort dagegen aufgebaut, während in einem Prä-Serum keine Antikörper gegen HE2 gefunden werden.

Als nächstes wurde untersucht, ob sich in dem Ziegen-Immunserum Immunglobuline nachweisen lassen, die an humane Krebszellen binden, die das TAA exprimieren, gegen das der MAK HE2 gerichtet ist (Ep-CAM). Dafür wurde die KATO III Magenkrebszelllinie herangezogen. Als Kontrolle wurde auch die Bindung an eine humane Zelllinie getestet, die Ep-CAM nicht exprimiert (WM9 Melanomzellen). Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe von Zell-ELISA Tests wie folgt durchgeführt:

Die Löcher einer Mikrotiterplatte werden mit je 100 μl einer Zellsuspension der zu testenden Zelllinie in der Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in Medium A über Nacht bei +4°C inkubiert.



Nach Absaugen des Überstandes wird die Platte mit je 50µl Fixierlösung pro Loch 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes werden je 200µl Blockierungspuffer B zupipettiert und die Platte 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 200µl Waschpuffer B werden je 100µl Aliquots der zu testenden Ziegenserum in Verdünnungen von 1:10 bis 1:100 000 in Verdünnungspuffer B 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Platte mit je 100 µl eiskaltem Waschpuffer B werden je 100µl des Peroxidase- konjugierten Kaninchen anti-Ziegen-Ig Antikörpers (Zymed) in einer Verdünnung von 1:1000 in Verdünnungspuffer A zugesetzt und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platte wird dreimal mit je 100 µl eiskaltem Waschpuffer B gewaschen. Die Antikörperbindung wird durch Zusatz von je 100µl des spezifischen Substrats nachgewiesen und die Farbreaktion durch Zugabe von je 50µl Stopplösung nach-ca. 5 Minuten abgebrochen. Die Auswertung erfolgt durch Messen der optischen Dichte (OD) bei 490nm (Wellenlänge der Referenzmessung ist 620nm).

Das Ergebnis dieser Experimente ist in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt: Das Ziegen-Immunserum enthält Immunglobuline, die stark auf den Ep-CAM positiven KATO-Zellen binden, während keine Bindung auf den Ep-CAM negativen WM9-Zellen nachgewiesen wird. Im Prä-Serum befinden sich keine Antikörper, die an diese Zellen binden. Dieses sehr überraschende Ergebnis zeigt, daß durch Vakzinierung mit HE2-F(ab)'₂ Fragment entstandene Antikörper tatsächlich in der Lage sind, selbst wieder an Zellen zu binden, die das TAA exprimieren, das HE2 erkennt. Offensichtlich konnte die Funktion des TAA zur Selbst-Adhäsion auf diese durch die Impfung mit HE2 entstandenen Antikörper übertragen werden, wie zuvor ausführlich erläutert wurde.

Um zu beweisen, daß die in den Ziegen durch Impfung mit dem F(ab)'₂-Fragment von HE2 gegen den Idiotyp dieses MAK entstandenen Antikörper tatsächlich diejenigen sind, die an die KATO-Zellen binden, wurde der anti-idiotypische Anteil dieser induzierten Antikörper mit Hilfe einer Sequenz von Immunaффinitäts-chromatographien spezifisch aus dem Ziegen-Immunserum gereinigt, wie grundsätzlich beschrieben (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:216, 1984). Die Sequenz der Reinigungsschritte ist hier noch einmal zusammengefaßt: In einem ersten Schritt wurde nach bekannten Methoden an einer DEAE Anionenaustauscher Säule eine Reinigung des im Ziegenserum enthaltenen IgG durchgeführt. Anschließend wurden an einer Immunaффinitätssäule (CH-Sepharose 4B, Pharmacia), an die irrelevantes murines IgG2a gekoppelt wurde, diejenigen Ziegenantikörper gebunden, die gegen konstante Regionen des F(ab)'₂-Fragmentes von HE2 gerichtet sind, während die Fraktion der anti-idiotypischen Ziegenantikörper nicht an dieser Säule bindet. In einem letzten Schritt wurde daher der Durchbruch dieser Immunaффinitätschromatographie an einer Immunaффinitätssäule (CH-Sepharose 4B, Pharmacia) gebunden, an die HE2 gekoppelt wurde. Die spezifisch an diese Säule gebundene Fraktion wurde mit einem Puffer pH 2,8 (0,1 M Glycin/HCl) eluiert und neutralisiert. Die so erhaltene Ziegen IgG Fraktion ist gegen den Idiotyp von HE2 gerichtet. Diese affinitätsgereinigten Ziegenantikörper wurden wieder auf ihre Bindung an die Ep-CAM positiven KATO-Zellen sowie an die Ep-CAM negativen WM9-Zellen untersucht. Diese Bestimmung wurde grundsätzlich gleich ausgeführt wie oben für Ziegenserum-Ig beschrieben. Statt Serumverdünnungen wurden Konzentrationen von 100 µg/ml bis 0,031µg/ml des immunaффinitätsgereinigten Ziegen-IgG bzw. von unspezifischem gereinigten Ziegen IgG verwendet.

Das Ergebnis dieser Experimente ist in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt: Das Ziegen-IgG, das gegen den Idiotyp von HE2 gerichtet ist, bindet stark an die Ep-CAM positiven KATO-Zellen, während unspezifisches Ziegen-IgG kaum bindet. Die Bindung des affinitätsgereinigten Ziegen IgG an die Ep-CAM negativen WM9-Zellen unterscheidet sich hingegen nicht von der des unspezifischen Ziegen-IgG. Damit ist bewiesen, daß diejenigen Antikörper, die durch Vakzinierung mit dem F(ab)'₂-Fragment von HE2 gegen den Idiotyp dieses Antikörpers direkt entstanden sind, auch an den Krebszellen binden, die das TAA exprimieren, das HE2 erkennt.

In weiterer Folge und aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse der Ziegenvakzinierung wurde ein Darmkrebspatient mit Metastasen (Dukes D) im Sinne einer Einzelbeobachtung mit dem MAK HE2 geimpft. Dabei wurde folgende Formulierung verwendet:
 0,83 ml einer Suspension von Alu-Gel (Alu-Gel S von Serva, 2% Suspension, Qualitätsgrad: Adjuvans zur Präparation von Vakzinen) wurde unter sterilen Bedingungen mit 0,5 ml einer Lösung von 10 mg/ml HE2 zusammen mit 3,67 ml PBS deficient eine Stunde bei Raumtemperatur sanft geschwenkt (Endkonzentration HE2: 1 mg/ml; Alu-Gel S: 0,33 %). Die Suspension wurde anschließend in 0,5 ml Aliquots in Durchstichfläschchen steril abgefüllt.

Der Patient wurde mit je 0,5 ml dieser Suspension (entspricht 0,5 mg HE2) insgesamt 4 mal subkutan vakziniert (Tag 1, 50, 78, 114). Vor jeder Impfung und am Tag 128 wurde Blut zur Serumgewinnung abgenommen. Es wurde zunächst untersucht, ob durch die Impfungen Antikörper induziert werden, die an KATO III-Zellen binden. Für diese Tests wurde wieder der Zell-ELISA eingesetzt, der mit den zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen Seren durchgeführt wurde wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, daß zur Detektion der gebundenen Humanantikörper ein Peroxidase konjugierter Ziegen-anti-Human-Ig Antikörper (Zymed) verwendet wurde.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Abbildung 6 gezeigt. Durch die Impfungen werden in diesem Krebspatienten offensichtlich substantielle Titer von Antikörpern induziert, die an KATO Zellen binden.

Weiters wurde untersucht, ob die durch die Vakzinierung mit HE2 induzierten Antikörper ex vivo einen zytotoxischen Effekt gegen KATO III Krebszellen vermitteln. Zu diesem Zweck wurden KATO III Zellen mit Prä- und Immunseren dieses Krebspatienten inkubiert, um eine durch die induzierten Antikörper mediierte Komplement abhängige Lyse zu zeigen. Dabei wurde nach an sich bekannter Methodologie wie folgt vorgegangen:

Ein Tag vor Durchführung des Tests werden KATO III Zellen in frisches Medium A transferiert und bei 37°C/5% CO₂ in einer Zellkulturflasche gehalten. Am nächsten Tag werden die Zellen zunächst mit ⁵¹Chrom markiert. Dabei werden 5x10⁶ Zellen in 800 µl Medium A bei 37°C/5% CO₂ mit 100 µCi Na₂⁵¹CrO₄ inkubiert, anschließend mit Medium A gewaschen und auf eine Dichte von 2,5x10⁵ Zellen/ml adjustiert. 100 µl Aliquots dieser Zellsuspension werden in Löcher einer Mikrotiterplatte pipetiert. 100 µl Aliquots der zu testenden Patientenseren werden zugegeben und 3 Stunden bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. Die Überstände werden mit einer Skatron-Harvesting-Pressen geerntet und in einem Gamma-Counter vermessen, wodurch die Werte für den "experimental release" erhalten werden. Für die Bestimmung des "total release" werden die Zellen wie oben behandelt, wobei Serum durch eine Lösung aus 2% SDS, 50 mM Na₂CO₃ and 10 mM EDTA ersetzt wird. Die Werte für den "spontaneous release" werden erhalten, in dem Serum durch Medium A ersetzt wird. Das Resultat wird wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Lyse} = \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{total release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

Der Test wird in 3-fach Werten durchgeführt und der Mittelwert und Standardabweichung der Einzelergebnisse angegeben.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt. Die durch die Impfung mit HE2 induzierten Antikörper sind offensichtlich in autologem Patientenserum in der Lage, mittels Komplement-abhängiger Lyse Ep-CAM positive KATO III-Zellen zu zerstören.

Auf Grund der oben beschriebenen Experimente ist beispielhaft gezeigt, daß die Vakzinierung mit geeigneten Antikörpern gegen ein Selbstadhäsions-TAA wie z.B. Ep-CAM,

00:30:00

51:09

oder deren Derivaten mit gleichem Idiotyp wie die jeweiligen Ausgangsantikörper, eine humorale Immunantwort auslöst, die selektiv auf Tumorzellen bindet, die dieses Selbstadhäsions-TAA exprimieren. Die induzierten Antikörper weisen ein zytotoxisches Potential gegen solche Tumorzellen auf. Eine Vakzinierung mit einem solchen Antikörper kann damit zu einer therapeutischen Wirkung bei Krebserkrankungen führen.

Patentansprüche:

00:30:00

11:00

Zusammenfassung

Antikörper gegen Tumor-assoziierte Antigene oder deren Derivate mit gleichem Idiotyp, können zur Vakzinierung gegen Krebserkrankungen verwendet werden.

Abbildung 1

Vakzinierung von Ziegen mit HE2-F(ab)'2:
 Serum Ig mit Spezifität für HE2

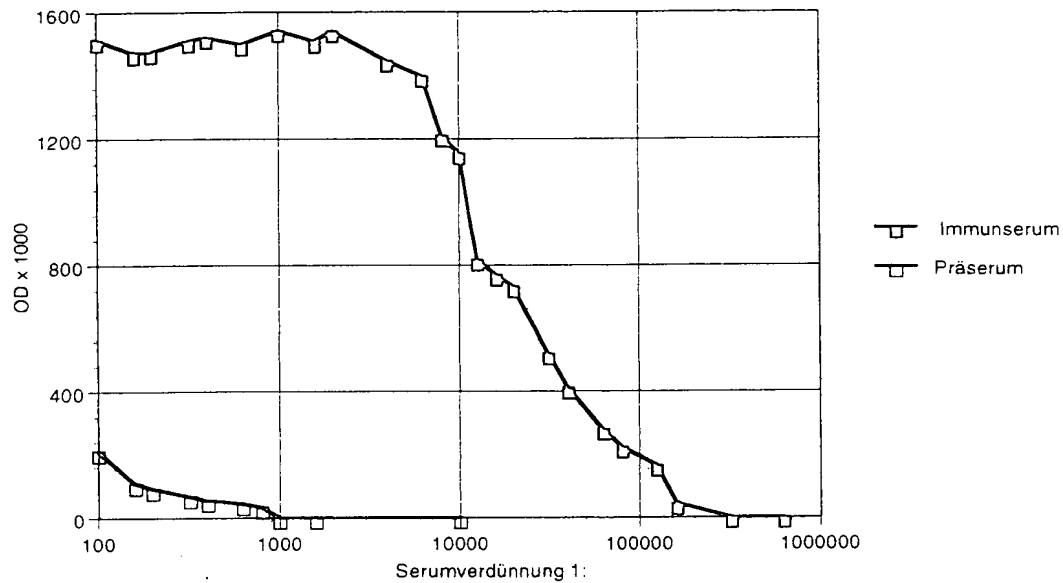


Abbildung 2

Vakzinierung von Ziegen mit HE2-F(ab)'2:
 Bindung von Serum Ig an Ep-CAM positive
 menschliche Magenkrebszellen (KATO III)

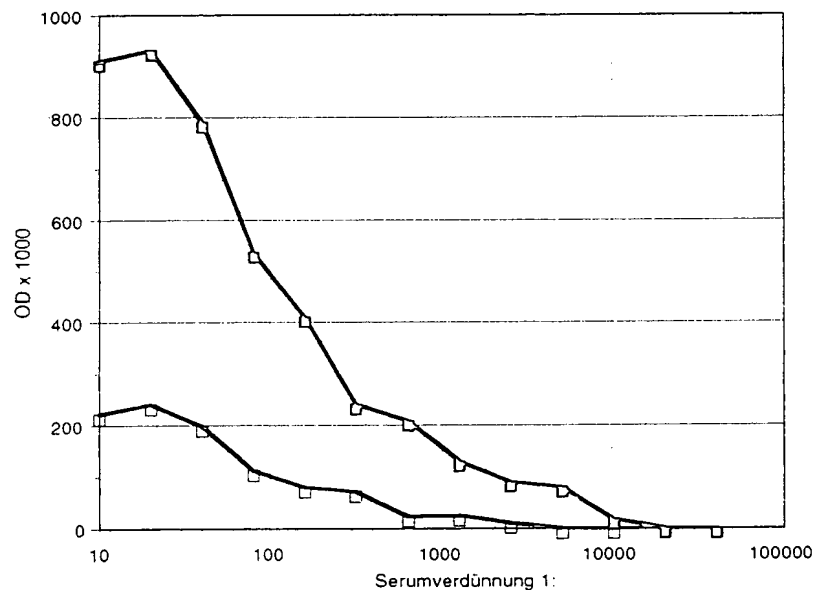


Abbildung 3

Vakzinierung von Ziegen mit HE2-F(ab)'2:
Bindung von Serum-Ig an Ep-CAM negative
menschliche Melanomzellen (WM9)

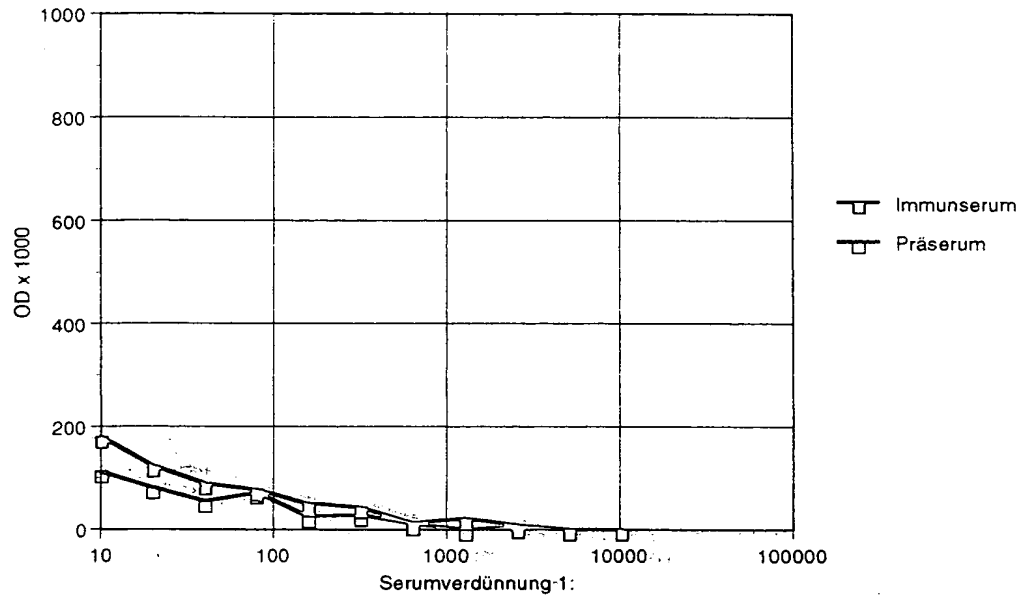
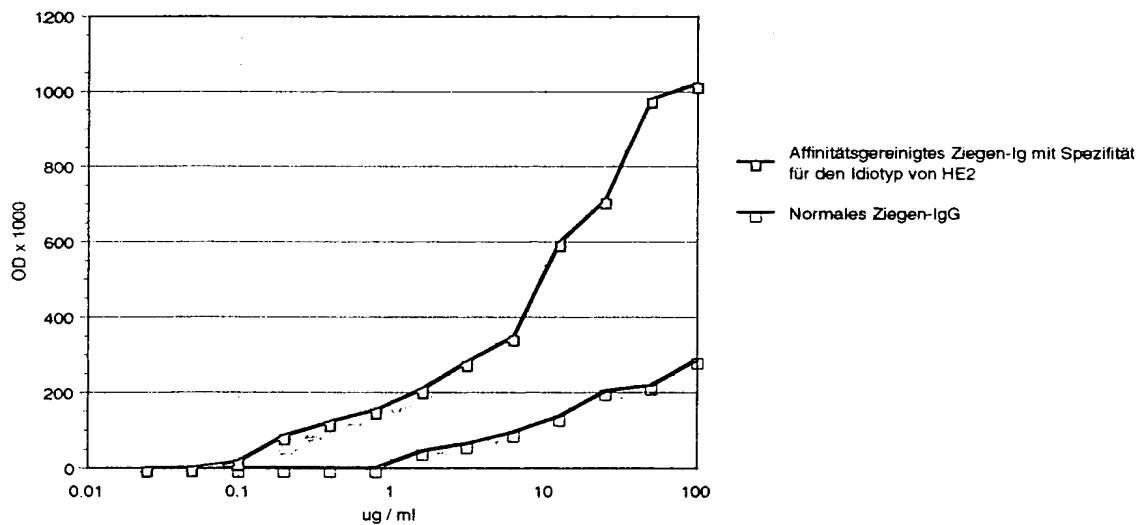


Abbildung 4

Vakzinierung von Ziegen mit HE2-F(ab)'2:
Bindung von affinitätsgereinigtem Serum Ig an Ep-CAM positive
menschliche Magenkrebszellen (KATO III)



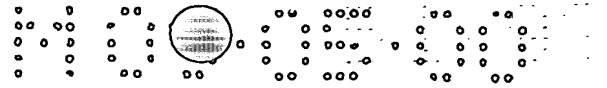


Abbildung 5

Vakzinierung von Ziegen mit HE2-F(ab)'2:
Bindung von affinitätsgereinigtem Serum Ig an Ep-CAM negative
menschliche Melanomzellen

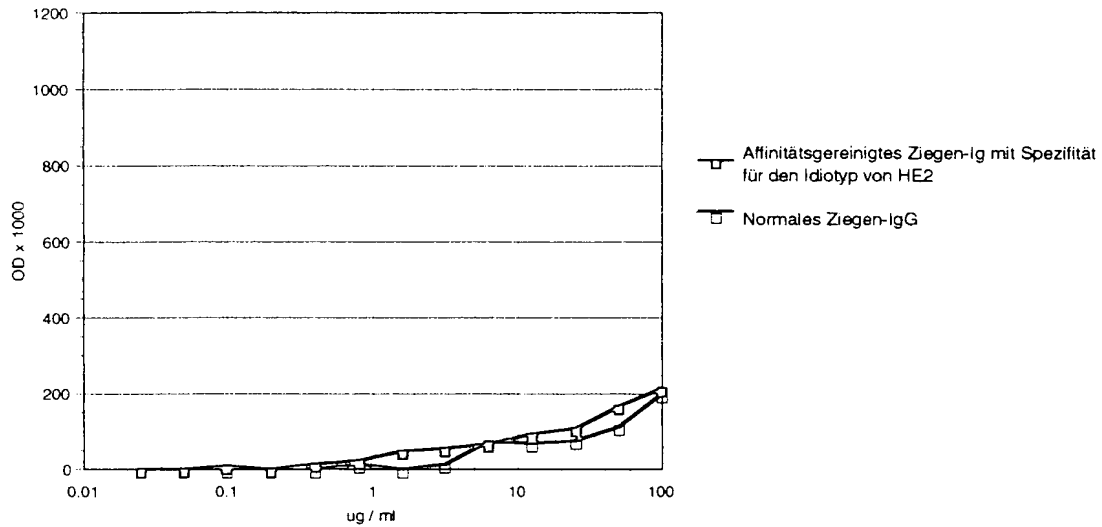


Abbildung 6

Vakzinierung eines Darmkrebspatienten mit HE2:
Induktion von Antikörpern gegen menschliche
Magenkrebszellen (KATO III)

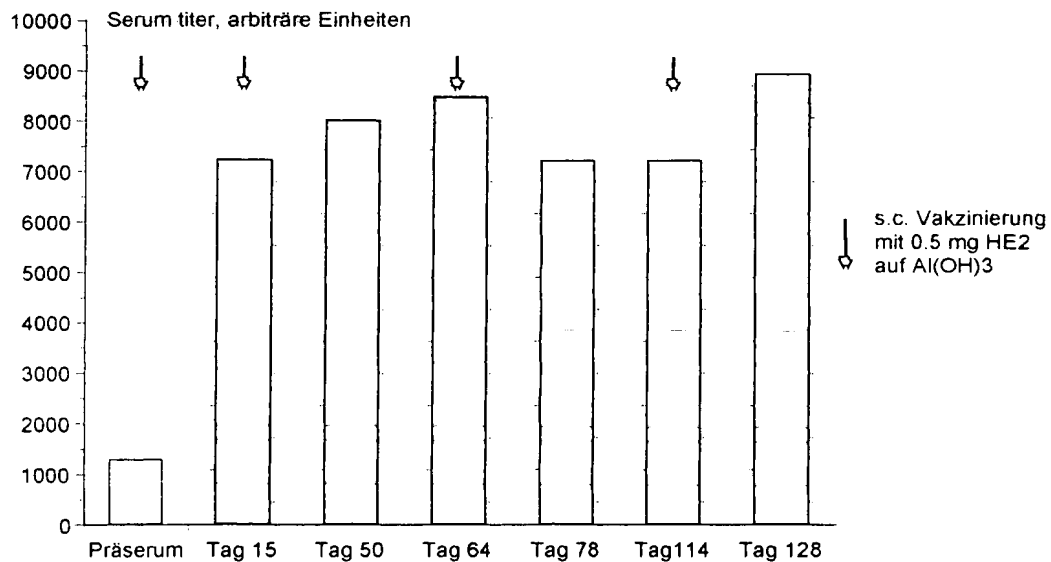


Abbildung 7

Vakzinierung eines Darmkrebspatienten mit HE2:
Induktion von Serum-Zytotoxizität gegen menschliche
Magenkrebszellen (KATO III)

